

06/05/2002

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
25 de Julio de 2002 (25.07.2002)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 02/056695 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A23B 7/10, A23L 1/218

(71) Solicitante: CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).

(21) Número de la solicitud internacional: PCT/ES02/00013

(72) Inventores: JIMENEZ DIAZ, Rufino; Duplex Torregreco, 33-A (La Motilla), E-41700 Dos Hermanas (ES). RUIZ BARBA, Jose, Luis; Chile 10, E-41012 Sevilla (ES).

(22) Fecha de presentación internacional: 15 de Enero de 2002 (15.01.2002)

(74) Mandatario: UNGRIA LOPEZ, Javier; Avda. Ramón y Cajal, 78, E-28043 Madrid (ES).

(25) Idioma de presentación: español

(81) Estados designados (nacional): BR, DZ, MA, TN.

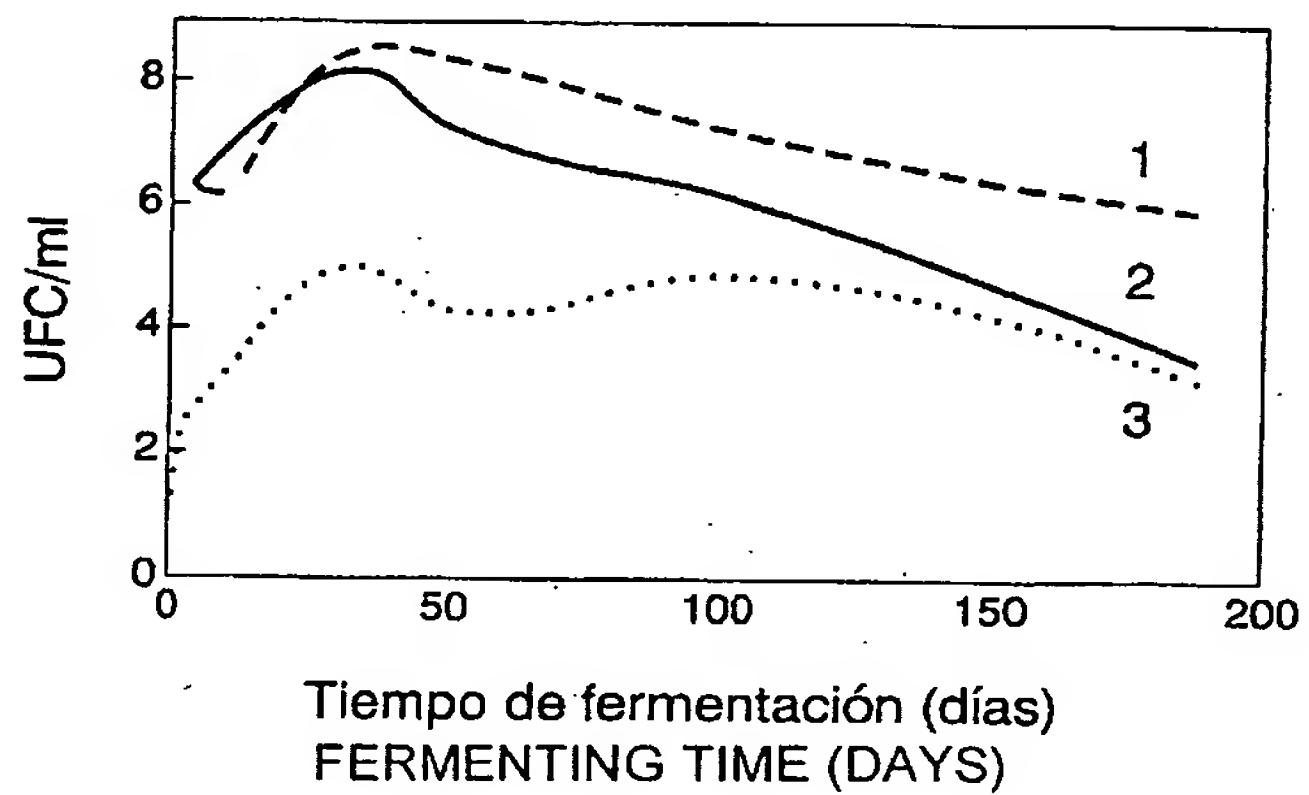
(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad: P 200100127 19 de Enero de 2001 (19.01.2001) ES

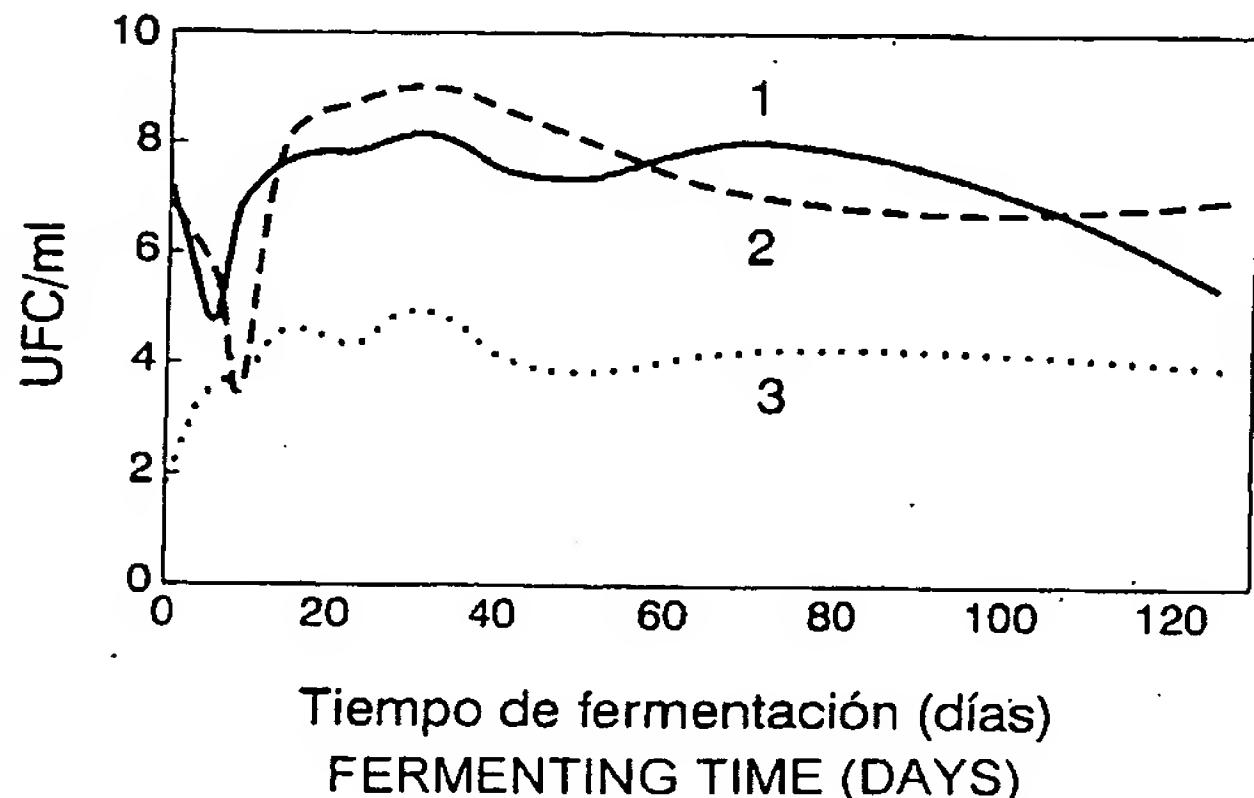
[Continúa en la página siguiente]

(54) Title: METHOD FOR OBTAINING VEGETABLE PRODUCTS THROUGH THE ADDITION OF MIXED LACTIC BACTERIAL STARTER CULTURES

(54) Título: PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS VEGETALES MEDIANTE LA ADICIÓN DE CULTIVOS INICIADORES MIXTOS DE BACTERIAS LACTICAS



(57) Abstract: The invention relates to a method for fermenting vegetable products applicable to, among others, gherkins, carrots and all possible varieties of olives. The inventive method comprises an additional stage to the traditional method, involving the inoculation of the brine, in which the vegetable products are placed, with a mixed culture comprising two micro-organisms: *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 (producer of plantaricin S with a high bacteriocin excretion efficiency in the medium) and *Lactobacillus plantarum* LP RJL3 (producer of extracellular polysaccharide). The inventive method provides the fermented product with a more homogeneous flavour, smell and quality as well as reducing spoilage significantly, which increases the output of the method.



(57) Resumen: La presente invención se refiere a un procedimiento de fermentación de productos vegetales aplicable, entre otros, a aceitunas de todas las variedades posibles, pepinillos y zanahorias. El procedimiento incluye como paso adicional al proceso tradicional, la inoculación de la salmuera en la que se colocan los productos vegetales, con un cultivo mixto compuesto por dos microorganismos: *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 (productor de plantaricina S con una alta eficiencia de excreción de la bacteriocina al medio) y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3 (productor de polisacárido extracelular). Con el procedimiento de la invención se consigue una mayor homogeneidad en el sabor, aroma y calidad del producto fermentado y una importante reducción del deterioro, con lo cual se aumenta el rendimiento del proceso.

WO 02/056695 A1



(84) **Estados designados (regional):** patente europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

Publicada:

— *con informe de búsqueda internacional*

)

**PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PRODUCTOS VEGETALES MEDIANTE
LA ADICIÓN DE CULTIVOS INICIADORES MIXTOS DE BACTERIAS
LÁCTICAS**

5

CAMPO TÉCNICO DE LA INVENCIÓN

La presente invención pertenece al campo técnico de la fermentación de productos vegetales, particularmente al sector de las fermentaciones de tales productos vegetales en salmuera con la adición de microorganismos.

10

ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR A LA INVENCIÓN

La fermentación de los productos vegetales, especialmente los productos vegetales alimenticios tales como las aceitunas verdes estilo español o sevillano, así como la de pepinillos y otros muchos productos vegetales -tales como las zanahorias-, siguen un patrón de elaboración tradicional. En dichas fermentaciones, el producto de partida se manipula de manera tal que ello permita el desarrollo en las salmueras de una microbiota espontánea, no inoculada, cuya procedencia es diversa (los propios productos, los utensilios para la manipulación de éstos, los fermentadores donde se va a llevar a cabo el proceso, etc.). Entre los microorganismos que componen dicha microbiota conviene destacar la especie *Lactobacillus plantarum*, una bacteria láctica que se ha asociado históricamente a un desarrollo adecuado de las mencionadas fermentaciones (Cruess, W.V. 1930. Pickling green olives. Calif. Agric. Exp. Stn. Bull. 498; Anderson, R. 1984. Characteristics of the bacterial flora isolated during spontaneous lactic acid fermentation of carrots and red beets. Lebensm. Wiss. U. Technol. 17:282-286; Daeschel et al. 1987. Microbial ecology of fermenting plant materials. FEMS Microbiol. Rev. 46:357-367). El desarrollo de esta especie bacteriana en las salmueras de fermentación se considera esencial para la conservación de dichos productos vegetales, ya que produce la cantidad de ácido láctico

necesaria para que dicha conservación sea efectiva.

Aunque se encuentra en pequeña proporción entre la población bacteriana que se desarrolla en los momentos iniciales de la fermentación, *L. plantarum* se convierte,

5 generalmente, en la especie dominante sobre otras bacterias lácticas y bacterias Gram negativas al poco tiempo de que los productos vegetales hayan sido colocados en la salmuera, coexistiendo en algunos casos (como en la fermentación de aceitunas y pepinillos) con una población de levaduras hasta el final del proceso fermentativo (de la

10 Borbolla y Alcalá et al. 1958. Estudio sobre el aderezo de aceitunas verdes. XV. La primera fase de la fermentación.

Grasas y Aceites 9:118-124; Fleming, H.P. 1984. Developments in cucumber fermentation. J. Chem. Tech.

15 Biotechnol. 34B: 241-252). Para conseguir un producto estable con el aroma y el sabor típicos de los productos fermentados (aceitunas, pepinillos, zanahorias, etc.), es esencial que todos esos microorganismos se desarrolleen en la salmuera siguiendo la secuencia correcta, tal como se ha descrito anteriormente (Fernández Díez, M.J. 1983. Food and 20 feed production with microorganisms. In G. Reed (ed.), Olives, pp. 379-397. Verlag Chemie, Basel; Garrido-Fernández et al. 1995. Food fermentations. In H.-J. Rehm and G. Reed (eds.), Olive Fermentations, pp. 593-627. VCH 25 Publishers Inc., New York, NY, USA; Fleming et al. 1995. Food fermentations. In H.-J. Rehm and G. Reed (eds.), Vegetable Fermentations, pp. 629-661. VCH Publishers Inc., New York, NY, USA).

Todas las fermentaciones naturales de productos vegetales 30 dependen de los microorganismos presentes en los productos de partida (la denominada flora o microbiota natural), en los utensilios con que se manipulan y en los recipientes (fermentadores) en que se almacena el producto para proceder a su fermentación. Esto hace que aparezcan con 35 frecuencia variaciones indeseables en el sabor, el aroma y

la calidad y que, en muchos casos, se deterioren cantidades importantes de producto. Por ello se hace necesario establecer mecanismos para controlar dichas fermentaciones, entre los que se considera potencialmente interesante la 5 utilización de cultivos iniciadores de *L. plantarum*. Se han descrito procedimientos para controlar la microbiota natural durante la fermentación de los productos vegetales, bien mediante inoculación directa con cultivos puros de *L. plantarum* (Fleming et al. 1985. The lactobacilli, 10 pediococci, and leuconostocs: vegetable products. In S.E. Gilliland (ed.), Bacterial Starter Cultures for Foods, pp. 97-118. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, USA), bien utilizando una salmuera que contuviera una población de lactobacilos activos (de la Borbolla y Alcalá et al. 1964. 15 Empleo de cultivos puros de lactobacilos en la preparación de aceitunas verdes. Grasas y Aceites 15:6-11). Sin embargo los resultados obtenidos no siempre han sido satisfactorios, debido principalmente a que los cultivos utilizados no habían sido optimizados previamente para 20 estas fermentaciones.

Una característica importante que debe tener un cultivo de *L. plantarum* que se vaya a utilizar como iniciador es su capacidad para dominar la microbiota indígena. Esta dominancia puede conseguirse bien mediante un rápido crecimiento de dicha bacteria láctica en las condiciones de fermentación, bien por la capacidad que tienen algunas cepas para producir ciertas sustancias antagonistas denominadas bacteriocinas (Marugg, J.D. 1991. Bacteriocins, their role in developing natural products. Food Biotechnol. 25 5:305-312; Daeschel, M.A. 1992. Bacteriocins of lactic acid bacteria. In B. Ray and M.A. Daeschel (eds.), Food Preservatives of Microbial Origin, pp. 323-345. CRC Press, Boca Raton, Fla., USA). El hecho de que el cultivo iniciador que se utilice sea capaz de producir bacteriocina 30 le proporciona "a priori" una ventaja selectiva no sólo

frente a la microbiota natural que puede desarrollarse durante la fermentación y que compite por los sustratos fermentables con *L. plantarum*, sino frente a la microbiota que puede deteriorar el producto, durante o después de la 5 fermentación.

Lactobacillus plantarum LPC010 es una bacteria láctica aislada de una fermentación de aceitunas verdes estilo español que produce dos bacteriocinas, llamadas plantaricinas S y T. Dichas bacteriocinas son activas 10 frente a gran número de microorganismos competidores de dicha cepa bacteriana en las salmueras de fermentación (otras cepas de *L. plantarum*, y otras especies de lactobacilos, leuconostocs, pediococos y estreptococos), así como frente a bacterias que pueden causar deterioros 15 del producto final en dichas fermentaciones, tal es el caso de propionibacterias y clostridios (Jiménez-Díaz et al. 1993. Plantaricins S and T, two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPC010 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59:1416- 20 1424). *L. plantarum* LPC010 se ha utilizado como cultivo iniciador de la fermentación de aceitunas verdes "estilo español" o "sevillano" a nivel de planta experimental (Ruiz-Barba et al. 1994. Use of *Lactobacillus plantarum* LPC010, a bacteriocin producer, as a starter culture in 25 Spanish-style green olive fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 60:2059-2064). Sin embargo, se ha comprobado que dicha cepa presenta ciertos problemas de retardo de crecimiento en las condiciones ambientales que se dan con frecuencia en las fermentaciones industriales de productos 30 vegetales, tales como amplios rangos de temperatura de fermentación, condiciones extremas de pH y salinidad y escasez o ausencia de nutrientes específicos en el medio de cultivo.

Por otro lado, *L. plantarum* LP RJ1, depositado en la 35 Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro 5102

(CECT 5102) es una cepa productora de plantaricina S. La utilización de dicho microorganismo como cultivo iniciador en las salmueras de fermentación de diferentes productos vegetales (aceitunas, pepinillos, alcaparrones y zanahorias, principalmente) constituye un paso esencial del denominado Procedimiento de fermentación de productos vegetales, objeto de la solicitud de patente española ES-A-2153318 y de su correspondiente extensión internacional WO-A-0060948. La aplicación de dicho microorganismo permite superar la mayoría de los problemas de falta de homogeneidad y de deterioro del producto final que suelen darse como consecuencia de aplicar el método tradicional en la elaboración de dichos productos vegetales fermentados. Sin embargo, si la carga microbiana inicial es muy elevada (bien provenga del producto de partida, de los utensilios de manipulación o de los contenedores del producto a fermentar), a pesar de producir plantaricina S, *Lactobacillus plantarum* LP RJ1 no es capaz de competir de forma eficaz contra esos microorganismos y, por tanto, su predominancia sobre los mismos en las salmueras de fermentación no se produce en el 100% de los casos. Ello puede llegar a ocasionar, a veces, problemas tales como fermentaciones incompletas, deterioro parcial de las características organolépticas del producto final, etc.

OBJETOS DE LA INVENCIÓN

Es un objeto de la presente invención, superar los inconvenientes del estado de la técnica mediante un nuevo procedimiento de fermentación que perfecciona los procedimientos convencionales a fin de mejorar la fermentación en salmuera, de los productos vegetales. Es otro objeto de la presente invención poner a disposición un procedimiento para la obtención de productos vegetales mediante fermentación ácido láctica que se puede aplicar a todas las variedades posibles de aceitunas, así como a pepinillos y zanahorias, entre otros vegetales con destino

al consumo humano o animal y que particularmente perfecciona el procedimiento que se describe en la solicitud de patente española ES-A-2153318 y en la solicitud de patente WO-A-0060948.

5 Otro objeto de la invención es un procedimiento basado en el proceso tradicional de fermentación, al que se le ha añadido una etapa más consistente en la inoculación de la salmuera en la que se colocan los productos vegetales con un cultivo mixto de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3.

10 También son objetos de la invención, los propios microorganismos utilizados en el procedimiento de fermentación, el uso de los microorganismos en el procedimiento de fermentación, y los productos fermentados 15 obtenidos.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCIÓN

Para lograr los objetos más arriba expuestos, la presente invención propone un procedimiento de fermentación de productos vegetales que se propone incluye las etapas de:

20 a) colocación de los productos vegetales en una salmuera que contiene cloruro sódico en un rango comprendido entre el 1 y el 15% (peso/volumen).

25 b) mantenimiento de dichos productos vegetales en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 210 días.

c) retirada del producto fermentado de la salmuera.

en cuyo procedimiento, entre las 2 y las 144 horas de la colocación de los productos vegetales en la salmuera se efectúa una inoculación de dicha salmuera con un cultivo mixto formado por los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro 5358 y 5359 (CECT 5358 y CECT 5359), respectivamente.

Este nuevo procedimiento de obtención de productos 35 vegetales fermentados que, mediante la inoculación de las

salmueras con un cultivo mixto de dos nuevos microorganismos (*L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3), elimina la posibilidad de cualquier tipo de deterioro, da lugar a un producto final homogéneo y 5 organolépticamente muy aceptable para el consumidor. Ello es posible porque el desarrollo combinado de ambas cepas en las salmueras de fermentación provoca un efecto inhibidor del desarrollo de cualquier otro microorganismo competidor de *L. plantarum*, incluso si la carga contaminante inicial 10 debida a otras bacterias lácticas es muy alta. Esto supone una mejora sustancial del procedimiento descrito en la solicitud de patente principal citada anteriormente. Dicha mejora viene dada por una serie de características tecnológicas muy interesantes de estas cepas que suponen 15 una ventaja frente a las de la cepa *L. plantarum* LP RJ1 descrita en la patente anteriormente citada. Entre otras, que *L. plantarum* LP RJL2 (productora de plantaricina S) es más eficiente que *L. plantarum* LP RJ1 en la producción de dicha bacteriocina, en tanto que *L. plantarum* LP RJL3 tiene 20 una alta tasa de crecimiento en salmueras de fermentación (superior a la de *L. plantarum* LP RJ1) y produce, además, polisacárido extracelular.

De acuerdo con la invención, los microorganismos pueden 25 inocularse suspendidos en un caldo de cultivo a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^{12} unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml) cada uno. El caldo de cultivo que se utilice puede ser medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada o solución salina. Alternativamente, los microorganismos pueden 30 introducirse también líofilizados.

Según el producto que se vaya a fermentar, por ejemplo 35 diversas variedades de aceitunas, pepinillos, alcaparrones, zanahorias etc., se ajustan los diversos parámetros del procedimiento: concentración del inóculo, momento en que se realiza la inoculación, tiempo de permanencia en la

salmuera, ajuste de la acidez del medio, etc.

Así, cuando se trata de fermentar aceitunas, el procedimiento incluye las siguientes etapas:

a) tratamiento de los frutos con hidróxido sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 10% (peso/volumen) durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas.

b) lavado con agua de las aceitunas tratadas en la etapa anterior durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 28 horas.

c) colocación de las aceitunas tratadas y lavadas en una salmuera de cloruro sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 15% (peso/volumen).

d) inoculación de la salmuera entre las 12 y las 96 horas despues de haberse colocado las aceitunas con un cultivo mixto de *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 a una concentración comprendida entre 10^4 y 10^8 UFC/ml.

e) mantenimiento de las aceitunas en dicha salmuera con inóculo durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 210 días.

Puede incluirse una etapa de regulación de la acidez, antes de la etapa d), mediante la adición de ácido clorhídrico, ácido acético o CO₂ hasta conseguir que el pH alcance un valor comprendido entre 4,5 y 6,5 unidades.

Para pepinillos y zanahorias, la inoculación del microorganismo se efectúa en las primeras 24 horas después de haberlos colocado en la salmuera, manteniéndose los pepinillos o las zanahorias en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 90 días

Son asimismo objetos de la presente invención el microorganismo *Lactobacillus plantarum* LPRJL2 y el *Lactobacillus plantarum* LPRJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los números 5358 y 5359, respectivamente.

La utilización de los mencionados microorganismos para la fermentación de productos vegetales, como por ejemplo aceitunas, pepinillos o zanahorias constituyen asimismo objetos de la presente invención, así como los productos 5 vegetales obtenidos mediante el procedimiento de la presente invención, en su caso aceitunas, pepinillos o zanahorias.

El procedimiento de fermentación de productos vegetales objeto de la presente invención se diferencia del proceso 10 tradicional porque incluye el paso adicional de la inoculación de la salmuera con un cultivo mixto de los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3. Por un lado, la alta tasa de crecimiento en condiciones naturales mostrada por *L. plantarum* LP RJL3 15 hace que esta cepa se desarrolle con rapidez en las salmueras de fermentación de vegetales, provocando una bajada rápida del pH de las mismas y propiciando así las condiciones ambientales para que se desarrolle de forma eficaz la cepa *L. plantarum* LP RJL2. Además, la cepa LP 20 RJL3 produce, en condiciones naturales de fermentación, un polisacárido extracelular que contribuye de manera eficaz a potenciar las características organolépticas del producto final. Por el otro, la capacidad de la cepa *L. plantarum* LP RJL2 de producir una bacteriocina, denominada plantaricina 25 S, cepa que va a ser utilizada también como cultivo iniciador (en cultivo mixto junto con *L. plantarum* LP RJL3) en la fermentación de diversos vegetales, le confiere una gran ventaja ecológica para imponerse a la flora bacteriana natural contaminante de estos productos y sobre aquella que pudiera contaminar el producto fermentado posteriormente y 30 causar alteraciones que lo hicieran no apto para su consumo y/o comercialización. La potenciación de la capacidad de competir de la cepa LP RJL2 con el resto de microflora contaminante, debida principalmente al hecho de producir la 35 bacteriocina plantaricina S, radica en el amplio espectro

de actividad de la misma y a la eficiencia de su excreción al medio de desarrollo de la cepa productora, siendo esta última propiedad más acusada que en la cepa *L. plantarum* LP RJ1, objeto de la solicitud de patente principal. Esta bacteriocina, que es una sustancia de naturaleza protéica y que la cepa LP RJL2 produce de forma natural, ha demostrado ser capaz de inhibir el desarrollo de distintas cepas de bacterias naturalmente presentes en productos vegetales en procesos de fermentación natural, incluyendo además aquellas que han sido descritas como alteradoras de la fermentación normal y/o del producto final, y también algunas bacterias patógenas para el hombre.

Dicha potenciación de la capacidad de la cepa LP RJL2 de competir con la flora microbiana contaminante natural redundante en una mayor rapidez a la hora de completar la fermentación de los vegetales en las condiciones descritas, con una mayor homogeneidad de los productos finales obtenidos. Asimismo, la acción inhibitoria de la bacteriocina producida por la cepa LP RJL2 a lo largo de la fermentación sobre posibles bacterias alteradoras, hace que el producto se conserve con mayores garantías y a más largo plazo. Al ser las bacteriocinas sustancias totalmente naturales e inocuas para otros organismos vivos que no sean aquellas bacterias a las que inhibe, su presencia en el producto final no puede calificarse como aditivo o conservante, puesto que forma parte del metabolismo natural de un microorganismo vivo usado tradicionalmente en la fermentación de productos vegetales.

A continuación, se describirán características prácticas de la invención en base a unos ejemplos en los que se hará referencia a unas figuras que forman parte integrante de la presente descripción, y en las que

la Figura 1 es una representación del desarrollo microbiano en una salmuera de fermentación de aceitunas verdes "estilo español" o "sevillano" variedad Hojiblanca,

inoculada con un cultivo iniciador mixto compuesto de *L. plantarum* LP RJL2 (productor de la bacteriocina plantaricina S) y *L. plantarum* LP RJL3 (no productor de plantaricina S), a lo largo de 187 días de fermentación.

5 Ensayo a nivel industrial (fermentador de 10.000 Kg); y la Figura 2 es una representación del desarrollo microbiano en una salmuera de fermentación de aceitunas verdes "estilo español" o "sevillano" variedad Hojiblanca, inoculada con un cultivo iniciador mixto compuesto de *L. plantarum* LP RJL2 (productor de la bacteriocina plantaricina S) y *L. plantarum* LP RJL3 (no productor de plantaricina S), a lo largo de 120 días de fermentación.

10 Ensayo a nivel semiindustrial o planta piloto (fermentador de 300 Kg).

15

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Fermentación a escala industrial de aceitunas.

Se tomaron 10.000 Kg de aceitunas verdes (*Olea europaea* L.) variedad Hojiblanca y se trataron con una solución de NaOH al 2,2 % (peso/volumen) en agua durante 8 horas en un

20 fermentador de fibra de vidrio. A este proceso se le denomina "cocido". La temperatura ambiente varió entre 17,7 y 21,3 °C durante dicho proceso, mientras que la temperatura en el interior del fermentador para el mismo periodo de tiempo estuvo comprendida entre 20,2 y 22,6 °C.

25 A continuación se tiró la solución de NaOH y se lavaron las aceitunas con agua corriente (denominado primer lavado). Una vez lavados, los frutos se dejaron en agua en el fermentador durante 3 horas (denominado segundo lavado). La temperatura en el interior del fermentador osciló entre los 30 19,7 y los 2,3 °C. Al cabo de las 3 horas de estar las aceitunas en agua, ésta se retiró y entonces los frutos se cubrieron con 6.000 litros de salmuera de cloruro sódico al 7,3 % (peso/volumen). A los tres días de estar colocadas las aceitunas en salmuera, se procedió a inocular éstas con 35 un cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L.*

plantarum LP RJL3 en fase estacionaria de crecimiento, crecidas en medio de cultivo MRS con 4% de NaCl (peso/volumen), a una concentración final de aproximadamente 10^6 UFC/ml cada una de ellas. Durante 5 aproximadamente 200 días se siguió el desarrollo microbiológico en el fermentador tanto de las cepas inoculadas como las de otros microorganismos que pudieran desarrollarse en las salmueras. Los resultados se presentan en la Figura 1.

10 Como se puede observar en dicha figura, los microorganismos *L. plantarum* LP RJL2 (curva 2) y *L. plantarum* LP RJL3 (curva 1), una vez inoculados en las salmueras de fermentación a una concentración de 10^6 UFC/ml, comienzan a desarrollarse hasta alcanzar un nivel máximo de 10^8 15 UFC/ml (en el caso de *L. plantarum* LP RJL2) o más de 10^8 UFC/ml (como es el caso de *L. plantarum* LP RJL3) a los 40 días de fermentación. Posteriormente, ambas poblaciones de lactobacilos van descendiendo paulatinamente y casi en paralelo hasta el final del proceso fermentativo, donde *L. 20 plantarum* LP RJL2 se sitúa en 10^4 UFC/ml (curva 2) y *L. plantarum* LP RJL3 en 10^6 UFC/ml. Es importante reseñar la ausencia de tiempo de adaptación de *L. plantarum* LP RJL2 a las salmueras de fermentación. Aunque el cultivo procede de un medio de laboratorio, la cepa LP RJL2 no presenta fase 25 de latencia (o retardo del crecimiento) lo que le confiere una considerable ventaja ecológica frente a otros microorganismos para una colonización adecuada del medio. Por otro lado, aunque la cepa LP RJL3 presenta una corta fase de latencia al ser inoculada en las salmueras, su 30 mayor velocidad de crecimiento hace que alcance muy rápidamente una alta densidad celular, lo que favorece sin duda el desarrollo de la cepa LP RJL2, al bajar el pH de las salmueras. La curva 3 representa el desarrollo de las poblaciones de levaduras (levaduras totales) en la misma 35 salmuera de fermentación donde se inoculó el cultivo mixto

de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3. Estas levaduras son microorganismos que aparecen espontáneamente en todo el proceso de fermentación de aceitunas verdes estilo "español" o "sevillano", ya que 5 forman parte de la microbiota contaminante de los frutos, utensilios y fermentadores. Supuestamente son responsables de algunas de las características organolépticas propias de este tipo de elaboración. Estas poblaciones alcanzan los niveles normales y no son inhibidos en su desarrollo por 10 ninguna de las dos cepas de lactobacilos inoculadas. Finalmente, llama la atención la ausencia de desarrollo de otras bacterias diferentes de las inoculadas en todo el proceso fermentativo, debido fundamentalmente a la actividad metabólica de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 en las salmueras de fermentación, pues 15 compiten de forma efectiva por los sustratos fermentables bien sea mediante una alta velocidad de crecimiento (caso de la cepa LP RJL3), bien sea por la producción de plantaricina S (caso de la cepa LP RJL2). En resumen, lo 20 que muestra esta figura es la capacidad de las cepas que constituyen el cultivo iniciador mixto para imponerse a la flora microbiana espontánea en las salmueras de fermentación de aceitunas verdes aderezadas al estilo "español" o "sevillano" y de completar satisfactoriamente 25 el proceso.

EJEMPLO 2: Fermentación a escala semiindustrial (planta piloto).

Se tomaron 300 Kg de aceitunas verdes (*Olea europaea* L.) 30 variedad Hojiblanca y se trataron con una solución de NaOH al 2,1 % (peso/volumen) en agua durante 7 horas y 30 minutos en un fermentador de fibra de vidrio. Durante el cocido, la temperatura en el interior del fermentador estuvo comprendida entre 21,3 y 23,5 °C. Al cabo de ese 35 tiempo, la solución de NaOH se tiró y las aceitunas se

sometieron a continuación a un primer lavado con agua corriente, efectuándose un segundo lavado con agua en el fermentador durante 3 horas. Después de ese tiempo, se retiró el agua y los frutos se cubrieron con unos 200 5 litros de salmuera de cloruro sódico al 6,6 % (peso/volumen). Inmediatamente después de colocar las aceitunas en salmuera, se procedió a inocularlas con un cultivo mixto de las cepas *L. plantarum* LP RJL2 y *L. plantarum* LP RJL3 en fase estacionaria de crecimiento, 10 crecidas en medio de cultivo MRS con 4% de NaCl (peso/volumen), a una concentración final de aproximadamente 10^7 UFC/ml cada una de ellas. Se siguió el desarrollo microbiológico en el fermentador tanto de las cepas inoculadas como las de otros microorganismos que pudieran desarrollarse en las salmueras durante unos 120 15 días. Los resultados se presentan en la Figura 2. A diferencia del caso anterior, la viabilidad de ambas cepas descendió en los primeros días entre 2 y 3 unidades logarítmicas (curva 1, *L. plantarum* LP RJL3; curva 2, *L. plantarum* LP RJL2) aunque casi inmediatamente después 20 alcanzaron niveles superiores a 10^8 UFC/ml y se mantuvieron en niveles altos hasta el final del proceso fermentativo. De la misma forma que en el caso anterior, se pudo detectar la presencia de poblaciones de levaduras 25 (curva 3), cuyos niveles se mantuvieron dentro de los márgenes adecuados a lo largo de la fermentación. De nuevo, no se detectaron otras poblaciones bacterianas en todo el proceso, lo que demuestra la eficacia de ambas cepas para colonizar las salmueras de fermentación.

REIVINDICACIONES

1.- Un procedimiento de fermentación de productos vegetales que incluye

5 una primera etapa en la que se colocan de dichos productos vegetales en una salmuera que contiene cloruro sódico en un rango comprendido entre el 1 y el 15% (peso/volumen);

10 una segunda etapa en la que dichos productos vegetales se mantienen en la salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 210 días para obtener productos fermentados; y

15 una tercera etapa en la que el producto fermentado se retira de la salmuera;

en donde entre 2 y 144 horas después de colocarse los 20 productos vegetales en la salmuera se efectúa una inoculación de dicha salmuera con un cultivo mixto formado por microorganismos *L. plantarum* LP RJL2, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro CECT5358, y *L. plantarum* LP RJL3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro CECT 5359.

25 2.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 1, en donde los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^{12} UFC/ml cada uno, suspendidos en un caldo de cultivo.

30 3.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 1, en donde los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10^5 y 10^8 UFC/ml suspendidos en un caldo de cultivo está seleccionado entre medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada y una solución salina.

35 4.- Un procedimiento de fermentación según la

reivindicación 1, en el que los microorganismos se inoculan en una concentración comprendida entre 10^6 y 10^8 UFC/ml y los microorganismos se introducen liofilizados.

5 5.- Un procedimiento de fermentación de productos vegetales, donde los productos vegetales que se fermentan son aceitunas, y en donde el procedimiento comprende una primera etapa en la que las aceitunas se colocan en una salmuera de cloruro sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 15% (peso/volumen);

10 una segunda etapa en la que las aceitunas se mantienen en dicha salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 30 y 210 días para obtener aceitunas fermentadas; y

15 una tercera etapa en la que las aceitunas fermentadas se retiran de la salmuera,

en donde entre 2 y 144 horas después de colocarse los productos vegetales en la salmuera se efectúa una inoculación de dicha salmuera con un cultivo mixto formado por microorganismos *L. plantarum* LP RJL2, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro CECT5358, y *L. plantarum* LP RJL3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro CECT 5359.

25 6. Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 5, en el que las aceitunas, antes de colocarse en la salmuera, han sido tratadas con hidróxido sódico a una concentración comprendida entre 1 y 10% (peso/volumen) durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas y lavadas con agua durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 28 horas

30 7.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 5, en el que antes de la inoculación de la salmuera se efectúa una regulación de acidez mediante

35

adicción de un ácido seleccionado entre ácido clorhídrico, ácido acético y CO₂ hasta conseguir un pH entre 4,5 y 6,5.

8.- Un procedimiento de fermentación según la 5 reivindicación 5, en el que los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10² y 10¹² UFC/ml cada uno, suspendidos en un caldo de cultivo.

9.- Un procedimiento de fermentación según la 10 reivindicación 5, en el que los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10⁵ y 10⁸ UFC/ml y el caldo de cultivo es medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada o una solución salina.

15 10.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 5, en el que los microorganismos se inoculan en una concentración comprendida entre 10⁶ y 10⁸ UFC/ml y los microorganismos se introducen liofilizados y suspendidos en un caldo de cultivo.

20 11.- Un procedimiento de fermentación de productos vegetales los productos que se fermentan están seleccionados entre pepinillos, zanahorias y combinaciones de los mismos, y donde el procedimiento comprende

25 una primera etapa en la que los productos vegetales se colocan en una salmuera de cloruro sódico a una concentración comprendida entre el 1 y el 15% (peso/volumen);

30 una segunda etapa en la que los productos vegetales se mantienen en dicha salmuera durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 90 días para obtener productos vegetales fermentados; y

una tercera etapa en la que los productos vegetales fermentados se retiran de la salmuera,

35 en el que, entre 2 y 24 horas después de colocarse los

productos vegetales en la salmuera, se efectúa una inoculación de dicha salmuera con un cultivo mixto formado por microorganismos *L. plantarum* LP RJL2, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro 5 CECT5358, y *L. plantarum* LP RJL3, depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo con nº de registro CECT 5359.

12.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 11, en el que al menos uno de los productos vegetales, antes de colocarse en la salmuera, han sido tratados con hidróxido sódico a una concentración comprendida entre 1 y 10% (peso/volumen) durante un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 15 horas y lavadas con agua durante un periodo de tiempo comprendido entre 1 y 28 horas

13.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 11, en donde los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10^2 y 10^{12} UFC/ml cada uno, suspendidos en un caldo de cultivo.

14.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 11, en donde los microorganismos se inoculan a una concentración comprendida entre 10^5 y 10^8 UFC/ml y suspendidos en un caldo de cultivo seleccionado entre medio MRS, salmuera de fermentación, leche descremada y una solución salina.

15.- Un procedimiento de fermentación según la reivindicación 10, en el que los microorganismos se inoculan en una concentración comprendida entre 10^6 y 10^8 UFC/ml y los microorganismos se introducen liofilizados y suspendidos en un caldo de cultivo.

16.- Utilización combinada de los microorganismos

Lactobacillus plantarum LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los nº 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de productos vegetales.

5

17.- Utilización combinada de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos Tipo el 18/X/2000 con los nº 5358 y 5359, respectivamente, 10 para la fermentación de aceitunas.

18.- Utilización combinada de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos 15 Tipo el 18/X/2000 con los nº 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de pepinillos.

19.- Utilización combinada de los microorganismos *Lactobacillus plantarum* LP RJL2 y *Lactobacillus plantarum* LP RJL3, depositados en la Colección Española de Cultivos 20 Tipo el 18/X/2000 con los nº 5358 y 5359, respectivamente, para la fermentación de zanahorias.

20.- Productos vegetales fermentados obtenidos mediante un 25 procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4.

21.- Aceitunas fermentadas obtenidas mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 30 5 a 10.

22.- Pepinillos fermentados obtenidos mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.

23.- Zanahorias fermentadas obtenidas mediante un procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones 5 a 10.

1/1

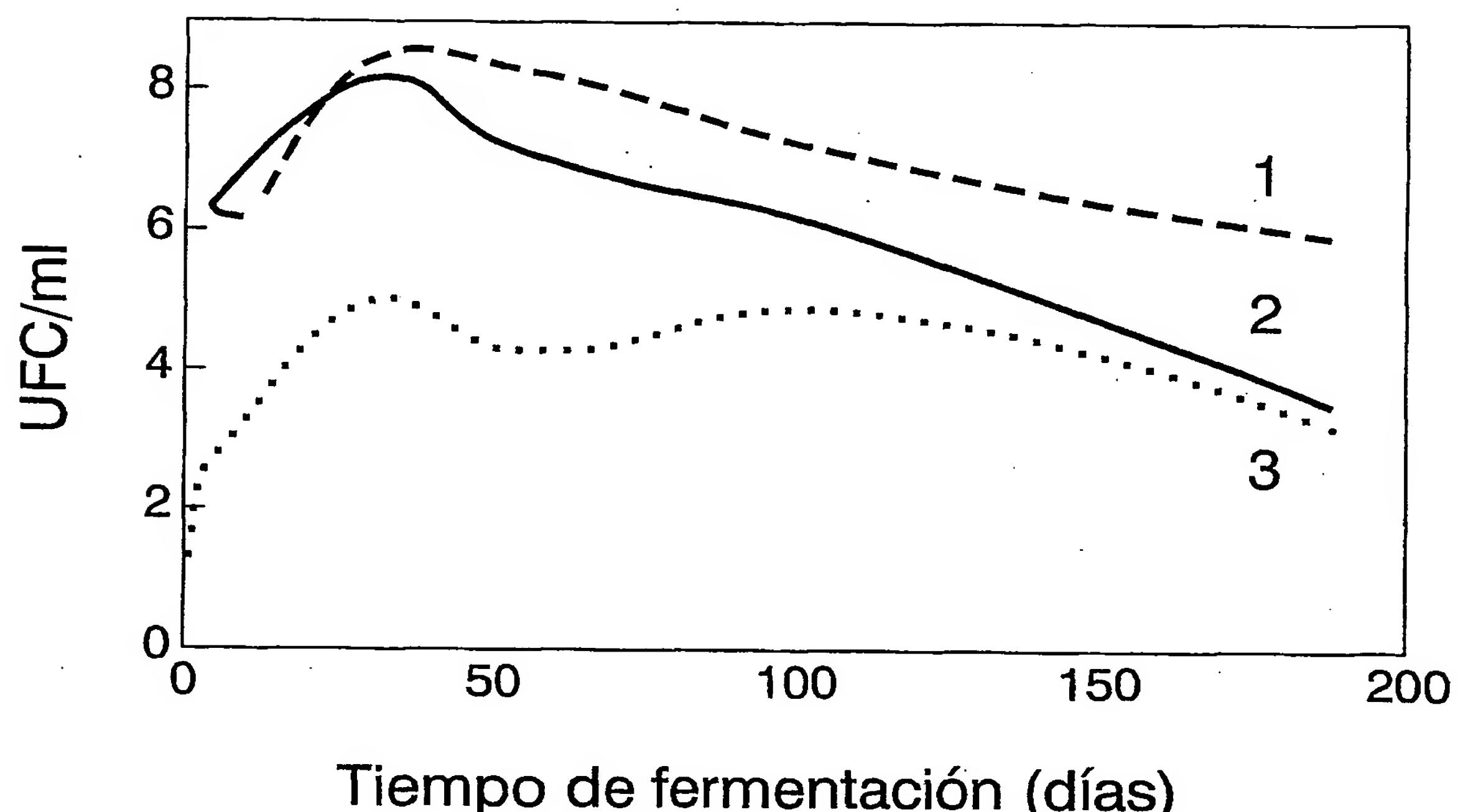


FIG.1

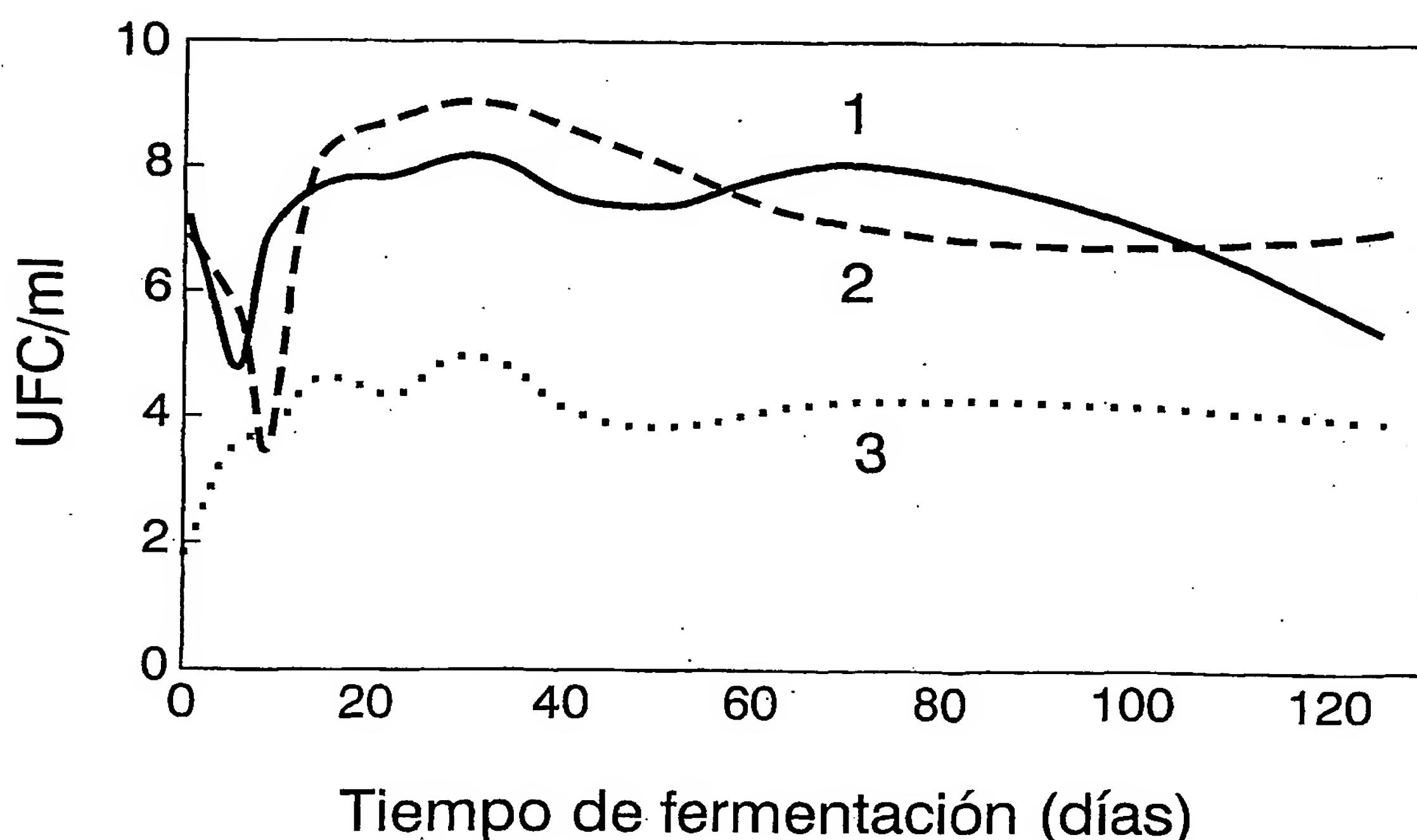


FIG.2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES 02/00013

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A23B 7/10, A23L 1/218

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 A23B, A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, WPI, EPODOC, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	RUIZ-BARBA J.L. et al. Use of lactobacillus plantarum LP 010, a Bacteriocin Producer, as a starter culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. Appl. ENVIRON MICROBIOL., June 1994, Vol.60, n° 6, pages 2059-2064	

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 April 2002 (24.04.02)

Date of mailing of the international search report

06 May 2002 (06.05.02)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ES 02/00013

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A23B 7/10, A23I 1/218

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima consultada (sistema de clasificación, seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A23B, A23L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados) CIBEPAT, WPI, EPDOC, BIOSIS

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	RUIZ-BARBA J.L. et al. Use of lactobacillus plantarum LP 010, a Bacteriocin Producer, as a starter culture in Spanish-Style Green Olive Fermentations. Appl. ENVIRON MICROBIOL., Junio 1994, Vol.60, nº 6, páginas 2059-2064	

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familia de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional. 24 abril 2002 (24.04.2002)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

06 MAY 2002

06.05.02

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional O.E.P.M.

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.
nº de fax +34 91 3495304

Funcionario autorizado

Juana López Nieto

nº de teléfono +34 91 3495536

THIS PAGE BLANK (USPTO)